

This Page Is Inserted by IFW Operations  
and is not a part of the Official Record

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning documents *will not* correct images,  
please do not report the images to the  
Image Problems Mailbox.**

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

PCT/EP 99 / 059 11 RAH  
**BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND**

097762691

**PRIORITY  
DOCUMENT**

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)



REC'D 28 SEP 1999

WIPO

PCT

**Bescheinigung**

GJW

EP 99/5911

Die Herren Universitäts-Professor Dr. med. Ulrich F r e i , Dr. med. Oliver D a n n e ,  
Universitäts-Professor Dr. Dr. h.c. Adolf Z s c h u n k e und Privatdozent Dr.sc.nat.  
Clemens M ü g g e , alle in Seeburg/Deutschland, haben eine Patentanmeldung unter  
der Bezeichnung

"Verfahren zur Erkennung und Diagnostik akuter koronarer Syndrome"

am 12. August 1998 beim Deutschen Patent- und Markenamt eingereicht.

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen  
Unterlagen dieser Patentanmeldung.

Die Anmeldung hat im Deutschen Patent- und Markenamt vorläufig die Symbole  
G 01 N, C 12 Q und A 61 B der Internationalen Patentklassifikation erhalten.

München, den 31. August 1999

Deutsches Patent- und Markenamt

Der Präsident

Im Auftrag

Dzierzon

Aktenzeichen: 198 36 617.5

M 09 09 99

# BOEHMERT & BOEHMERT

## ANWALTSSOZietät

Boehmert & Boehmert • Helene-Lange-Straße 3 • D-14469 Potsdam

An das  
Deutsche Patentamt  
Zweibrückenstr. 12  
80297 München

DR.-ING. KARL BOEHMERT, PA (1933-1973)  
DIPL.-ING. ALBERT BOEHMERT, PA (1954-1993)  
WILHELM J. H. STAHLBERG, RA, BREMEN  
DR.-ING. WALTER HOORMANN, PA\*, BREMEN  
DIPL.-PHYS. DR. HEINZ GODDAR, PA\*, MÜNCHEN  
DR.-ING. ROLAND LIESEGANG, PA\*, MÜNCHEN  
WOLF-DIETER KUNTZE, RA, BREMEN, ALICANTE  
DIPL.-PHYS. ROBERT MÜNZHUBER, PA (1963-1992)  
DR. LUDWIG KOUKER, RA, BREMEN  
DR. (CHEM.) ANDREAS WINKLER, PA\*, BREMEN  
MICHAELA HUTH-DIERIG, RA, MÜNCHEN  
DIPL.-PHYS. DR. MARION TÖNHARDT, PA\*, DÜSSELDORF  
DR. ANDREAS EBERT-WEIDENFELLER, RA, BREMEN  
DIPL.-ING. EVA LIESEGANG, PA\*, BERLIN

PA - Patentanwalt/Patent Attorney  
RA - Rechtsanwalt/Attorney at Law  
\* - European Patent Attorney

Alle zugelassen zur Vertretung vor dem EU-Markenamt, Alicante  
Professional Representation at the EU-Trademark Office, Alicante

PROF. DR. WILHELM NORDEMANN, RA, BRANDENBURG  
DR. AXEL NORDEMANN, RA, POTSDAM  
DR. JAN BERND NORDEMANN, LL.M., RA, BERLIN  
DIPL.-PHYS. EDUARD BAUMANN, PA\*, HÖHENKIRCHEN  
DR.-ING. GERALD KLÖPSCH, PA\*, DÜSSELDORF  
DR. (CHEM.) HELGA KUTZENBERGER, PA\*, DÜSSELDORF  
DIPL.-ING. HANS W. GROENING, PA\*, MÜNCHEN  
DR. ANKE SCHIERHOLZ, RA, POTSDAM  
DIPL.-ING. DR. JAN TÖNNIES, PA, RA, KIEL  
DIPL.-PHYS. CHRISTIAN BIEHL, PA\*, KIEL  
DIPL.-PHYS. DR. DOROTHÉE WEBER-BRÜLS, PA\*, FRANKFURT  
DR.-ING. MATTHIAS PHILIPP, PA\*, BREMEN  
DIPL.-PHYS. DR. STEFAN SCHOHE, PA\*, LEIPZIG  
MARTIN WIRTZ, RA, BREMEN  
DR. DETMAR SCHÄFER, RA, BREMEN  
DIPL.-CHEM. DR. ROLAND WEIß, PA, DÜSSELDORF  
DIPL.-PHYS. DR.-ING. UWE MANASSE, PA, BREMEN  
DR. CHRISTIAN CZYCHOWSKI, RA, BERLIN

Ihr Zeichen  
Your ref.  
Neuanmeldung

Ihr Schreiben  
Your Letter of

Unser Zeichen  
Our ref.  
D 2867

Potsdam

12. August 1998

Univ.-Prof. Dr. med. Ulrich Frei  
Dr. med. Oliver Danne  
Univ.-Prof. Dr. Dr. h.c. Adolf Zschunke  
Privatdozent Dr. sc. nat. Clemens Mügge

### Verfahren zur Erkennung und Diagnostik akuter koronarer Syndrome

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Erkennung und Diagnostik akuter koronarer Syndrome, insbesondere des akuten Myokardinfarktes (AMI).

Akute koronare Syndrome umfassen die Krankheitsbilder des akuten Myokardinfarktes (AMI) und der instabilen Angina pectoris, welche durch die WHO-Klassifikation des AMI und die Braunwald-Klassifikation der instabilen Angina pectoris definiert werden (Gillum R.F. et al. 1984, Am Heart J 108: 150-158; Braunwald E. et al. 1994, Circulation 90: 613-622).

2157

Helene-Lange-Straße 3 • D-14469 Potsdam • Telefon (03 31) 27 54 30 • Telefax (03 31) 2 75 43 21

MÜNCHEN - BREMEN - BERLIN - FRANKFURT - DÜSSELDORF - POTSDAM - BRANDENBURG - HÖHENKIRCHEN - KIEL - LEIPZIG - ALICANTE  
e-mail: Postmaster@Boehmert.Boehmert.de

Akute koronare Syndrome stellen einen häufigen und lebensbedrohlichen Erkrankungskomplex dar, bei dem die frühzeitige sichere Diagnose und Therapie entscheidend für das Überleben des Patienten sein kann. Dies trifft besonders auf den akuten Myokardinfarkt zu, bei dem eine Verzögerung der richtigen Diagnose und Therapie schwerwiegende Folgen für den Patienten hat. Bekannte Methoden zum Diagnostizieren eines Myokardinfarktes sind das Elektrokardiogramm und die Bestimmung verschiedener Labor-Marker. Das Elektrokardiogramm und die bisher bekannten Labor-Marker haben in der Frühphase des akuten Myokardinfarktes eine zu geringe Sensitivität, um bei einer Mehrheit der Patienten die Diagnose stellen zu können. So liegt die Sensitivität von infarkttypischen Veränderungen im EKG (ST-Hebungen) bei 46 % (Rude, R.E. et al. 1983, Am J Cardiol 52:936-942). Die Sensitivität der Labor-Marker Creatinkinase (CK)-Aktivität, CK-MB-Aktivität, CK-MB-Masse, der CK-MB-Isoformen, von Myoglobin und kardialen Troponinen liegt in den ersten 2 Stunden nach Schmerzbeginn zwischen 11-29 % (Mair, J. et al. 1994, Mitteilungen der Deutschen Gesellschaft für Klinische Chemie 25: 1-6). Die begrenzte diagnostische Brauchbarkeit der bekannten Verfahren in der Frühphase des akuten Myokardinfarktes verursacht eine Reihe von klinischen Problemen, wie die Gefahr von Fehldiagnosen, die Durchführung nicht-indizierter Therapien und die Verzögerung lebensrettender Therapien.

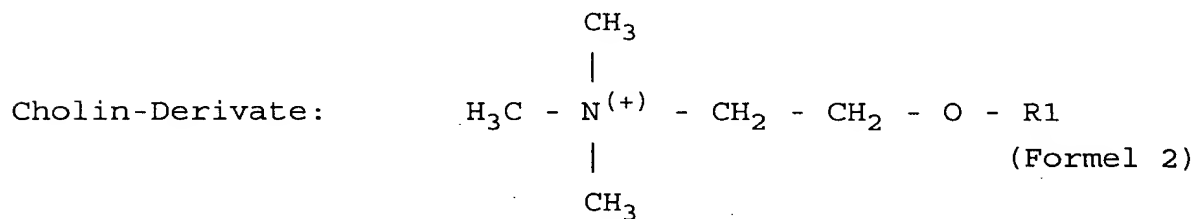
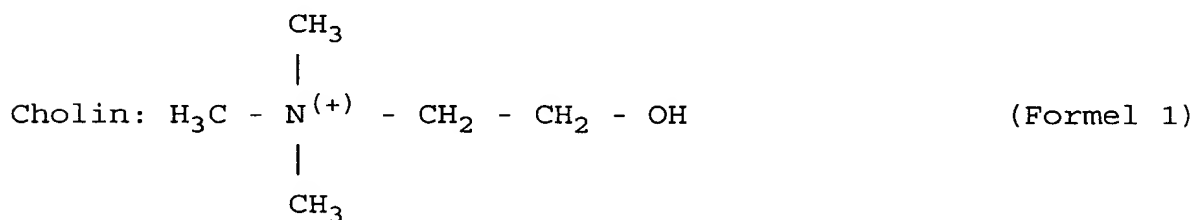
Bei der instabilen Angina pectoris können Risikopatienten durch die Bestimmung der kardialen Troponine relativ zuverlässig erkannt werden, die langsame Freisetzungskinetik bedingt aber, daß es auch hier in der Frühphase zu falsch-negativen Befunden kommt. Dies ist problematisch, weil diese Patienten eine ähnlich schlechte Prognose wie Patienten mit AMI haben können und eine rasche und gezielte antiischämische Therapie benötigen. Es besteht daher ein erheblicher Bedarf an Verfahren, die eine zuverlässige und frühzeitige

Erkennung akuter koronarer Syndrome, insbesondere des akuten Myokardinfarktes, ermöglichen.

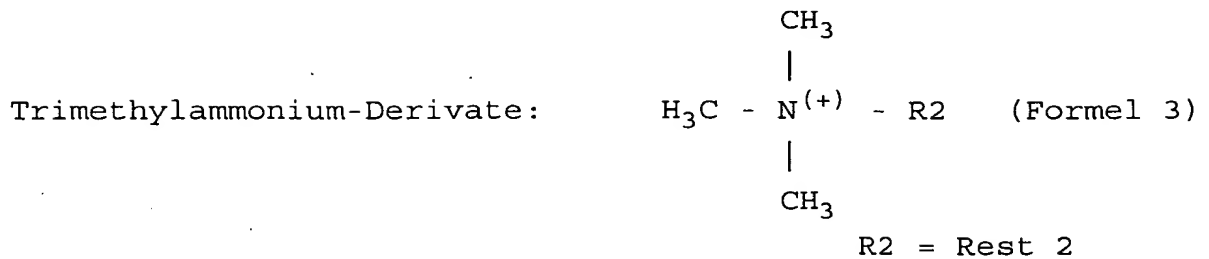
Die Erfindung hat daher zur Aufgabe, eine Methode anzugeben, welche die frühzeitige Erkennung akuter koronarer Syndrome ermöglicht und somit die Diagnose und Therapie der erkrankten Patienten verbessert.

Diese Aufgabe wird durch ein Verfahren mit den Merkmalen von Anspruch 1 gelöst. Bei dem erfindungsgemäßen Verfahren zur Erkennung akuter koronarer Syndrome, insbesondere des akuten Myokardinfarktes, wird der Gehalt von Cholin, Cholin-Derivaten und/oder Trimethylammonium-Derivaten in geeigneten Körperflüssigkeiten oder Körperbestandteilen, die einem Patienten entnommen wurden, bestimmt und bewertet.

Cholin, Cholin-Derivate und Trimethylammonium-Derivate sind Bestandteile des Lipidstoffwechsels und werden im folgenden zusammenfassend als "CCTD " bezeichnet. CCTD haben folgende Strukturelemente:



R1 = Rest 1



Die Formel 1 zeigt, daß Cholin [2 Hydroxyethyl]trimethylammoniumion darstellt. Formel 2 zeigt die allgemeine chemische Formel für Cholin-Derivate wie Phosphocholin, Glycerophosphocholin, Phosphatidylcholin, Lysophosphatidylcholin, Acetylcholin und Plasmalogene, wobei R1 jeweils eine charakteristische chemische Gruppe darstellt. Die negative Ladung kann sich im gleichen Molekül oder in einem Gegenion befinden. Formel 3 zeigt die allgemeine chemische Formel von Trimethylammonium-Derivaten, wie Carnitin und Betain, wobei R2 jeweils eine charakteristische chemische Gruppe darstellt. Die Mehrzahl der CCTD sind entweder Bestandteile von Phospholipiden, welche Bausteine von biologischen Membranen darstellen oder eng mit dem Stoffwechsel der Phospholipide verbunden. Herzmuskelzellen sind besonders reich an Phosphatidylcholin, welches ein cholinhaltiges Phospholipid darstellt. Phosphatidylcholin ist zudem das vorherrschende Phospholipid in den Membranen der Mitochondrien, die einen bedeutsamen Teil der Myokardmasse ausmachen. Die Aktivierung von myokardialen Phospholipasen in der Frühphase des akuten Myokardinfarktes sowie die Störungen des Lipidstoffwechsels bei schwerer Myokardischämie führen entsprechend den Ergebnissen der Anmelder zu einer ausgeprägten Freisetzung von Cholin, Cholin-Derivaten und/oder der chemisch verwandten Trimethylammonium-Derivate und verursachen eine Zunahme der Konzentration der CCTD in bestimmten Körperflüssigkeiten und Körperbestandteilen. Inwieweit nicht-myozytäre Elemente einschließlich der Endothel- und glatten Gefäßmuskelzellen daran beteiligt sind, ist nicht bekannt. Die chemische Verwandheit von Cholin, Cholin-Derivaten und Trimethylammonium-De-

rivaten und ihr gleichartiges Verhalten bei pathophysiologischen Prozessen begründet die zusammenfassende Betrachtungsweise als CCTD.

Die diagnostische Nutzung der Freisetzung von Cholin, Cholin-Derivaten und Trimethylammonium-Derivaten zur Erkennung akuter koronarer Syndrome und des akuten Myokardinfarktes beim Menschen ist bisher noch nicht beschrieben worden. Bekannt ist lediglich, daß bei experimentellen Versuchsanordnungen in der Frühphase der Myokardischämie ein Anstieg von Lysophosphoglyceriden (z.B. Lysophosphatidylcholin) im Myokard sowie im venösen und lymphatischen Effluat zu beobachten ist (Corr P.B. et al. 1987, J Mol Cell Cardiol 19: 34-53; Snyder D.W. 1981, Am J Physiol 241: H700-H707; Akita H. et al. 1986, J Clin Invest 78: 271-280). Dabei wurde aber in keiner Publikation ein Verfahren für die Bewertung des Gehaltes von Cholin, Cholin-Derivaten und Trimethylammonium-Derivaten in Körperflüssigkeiten für die Diagnose eines akuten koronaren Syndroms bzw. eines akuten Myokardinfarktes beim Menschen eingesetzt. Hintergrund der genannten Publikationen ist vielmehr die Beobachtung, daß Lysophosphatidylcholin offenbar proarrhythmische Effekte hat und daß Medikamente, die einen Anti-Lysophosphatidylcholin-Effekt haben, möglicherweise sinnvolle Therapeutika sein könnten.

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Erkennung akuter koronarer Syndrome, insbesondere des akuten Myokardinfarktes, durch die Bestimmung und Bewertung des Gehalts von CCTD in Körperflüssigkeiten oder Körperbestandteilen. Das Verfahren ist dabei weitgehend unabhängig von der Art der gewählten Bestimmungsmethode, solange Cholin, Cholin-Derivate und/oder Trimethylammonium-Derivate oder deren Reaktionsprodukte bestimmt werden. Methoden zur Bestimmung von Cholin, Cholin-Derivaten und/oder Trimethylammonium-Derivaten in Körperflüssigkeiten oder Körperbestandteilen

stellen z.B. biochemische bzw. enzymatische Methoden (Takayama, M. et al. 1977, Clin Chim Acta 79: 93-98), Hochleistungs-Flüssigkeits-Chromatographie (HPLC) (Potter, P. et al. 1983, J Neurochem 41: 188-94) sowie Gaschromatographie und Massenspektrometrie (Pomfret, A. et al. 1989, Anal Biochem 180: 85) und von den Anmeldern entwickelte quantitative NMR-Spektroskopische Methoden dar. Übersichten zur Analytik von Phospholipiden wurden von Olsson publiziert (Olsson, N.U. et al. 1997, J Chromat 692: 245). Die in den genannten Druckschriften beschriebenen Verfahren werden durch Bezugnahme in die vorliegende Anmldung aufgenommen. Grundsätzlich kann die Bestimmung von CCTD und deren Reaktionsprodukte in vivo oder in vitro erfolgen.

Die Erfindung ist im folgenden anhand von Ausführungsbeispielen erläutert.

- Fig. 1 zeigt ein  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum einer Blutprobe eines Patienten;
- Fig. 2 zeigt vergrößerte Ausschnitte von zur Figur 1 analogen Spektren bei einem Patienten mit akutem Myokardinfarkt (A) und bei einem Patienten ohne akuten Myokardinfarkt (B);
- Fig. 3 zeigt die Daten zur diagnostischen Wertigkeit von CCTD für die Diagnose eines akuten Myokardinfarktes im gesamten Prüfzeitraum;
- Fig. 4 zeigt die Daten zur diagnostischen Wertigkeit von CCTD für die Diagnose eines akuten Myokardinfarktes in der Frühphase des AMI (0 bis 6 Stunden);
- Fig. 5 zeigt die Daten zur diagnostischen Wertigkeit von CCTD für die Diagnose eines akuten Myokardinfarktes in der Frühphase des AMI (0 bis 3 Stunden); und
- Fig. 6 zeigt die Daten zur diagnostischen Wertigkeit von CCTD für die Diagnose eines akuten Myokardinfarktes in der Spätphase des AMI (7 bis 35 Stunden).

### Auswahl und Entnahme einer geeigneten Probe einer Körperflüssigkeit

Für die Durchführung des Verfahrens ist die Entnahme einer Probe einer Körperflüssigkeit notwendig. Die diagnostische Wertigkeit des Verfahrens ist abhängig von der gewählten Körperflüssigkeit. Die Durchführung des Verfahrens ist beispielsweise durch die Untersuchung von Blutproben bzw. verarbeiteten Blutproben, wie Plasma, Serum oder Vollblut möglich. Neben Blutproben können für das Verfahren auch andere Körperflüssigkeiten, wie Harn, untersucht werden. CCTD werden zu einem bestimmten Teil glomerulär filtriert und erscheinen daher auch im Harn. Dabei ist aber im Vergleich zu Untersuchungen in Blutproben mit einer zeitlichen Verzögerung von Konzentrationsänderungen zu rechnen, was ein Nachteil der Verwendung von Harn darstellt. Zudem läßt sich Harn nicht in jedem Fall so unkompliziert und rasch gewinnen wie Blut, was ebenfalls ein Nachteil darstellt. Vorteilhaft bei der Verwendung von Harnproben ist die Tatsache, daß häufig größere Probenmengen zur Verfügung stehen und daß durch die Messung einer Konzentration in einer Harnprobe, die über einen größeren Zeitraum produziert worden ist, auch pathophysiologische Vorgänge über ein größeres Zeitintervall erfaßt werden können. Dennoch ist aus den genannten Gründen für die Durchführung des Verfahrens die Verwendung von Blutproben bzw. verarbeiteten Blutproben in der Regel vorzuziehen. Die Bestimmung in anderen Körperbestandteilen und Körperflüssigkeiten, wie Gewebeproben, Lymphe, Kapillarblut und organbezogenen venösen und arteriellen Blutproben kann in Einzelfällen sinnvoll sein. Bei der Probenentnahme sollten weitere Punkte berücksichtigt werden. Die exogene Zufuhr größerer Mengen von Cholin, Cholin-Derivaten oder Trimethylammonium-Derivaten vor der Probenabnahme sollte ausgeschlossen werden. Außerdem sollte für die Früherkennung akuter koronarer Syndrome die Probenabnahme so früh wie möglich erfolgen und gegebenenfalls periodisch wiederholt werden.

## **Bestimmung von Cholin, Cholin-Derivaten und Trimethylammonium-Derivaten in der Probe einer Körperflüssigkeit**

Das erfindungsgemäße Diagnostizier- und Bewertungsverfahren ist weitgehend unabhängig von der Bestimmungsmethode, solange damit Cholin, Cholin-Derivate und/oder Trimethylammonium-Derivate bestimmt werden können. Bei den hier beschriebenen Ausführungsbeispielen wurden die  $^1\text{H}$ -NMR-Spektroskopie, die als primäres Meßverfahren auch zur Validierung verwendet werden kann, sowie eine biochemische Bestimmungsmethode gewählt, die günstig für die unkomplizierte Durchführung in bestehenden klinisch chemischen Analysesystemen im klinischen Alltag ist. Klinisch chemische oder andere Methoden sowie Schnelltests zur Bestimmung von CCTD sollten vor ihrer Anwendung auf ihre analytische Qualität überprüft und validiert werden. Für die Anwendung zur Diagnostik von akuten koronaren Syndromen sollten dabei möglichst nur solche Methoden eingesetzt werden, die sich im Vergleich zur  $^1\text{H}$ -NMR-Spektroskopie als weitgehend gleichwertig oder überlegen erweisen. Die im folgenden genannten methodischen Ausführungen stellen Beispiele dar; d.h. hinsichtlich der Qualität und Quantität können andere Chemikalien, Lösungen, Reagenzien und Geräte als die beschriebenen eingesetzt werden, wenn damit vergleichbare Ergebnisse erzielt werden. Grundsätzlich genügt für die Durchführung des Verfahrens die Anwendung einer validen Meßmethode für CCTD in einer geeigneten Körperflüssigkeit.

**Ausführungsbeispiel: Bestimmung von Cholin, Cholin-Derivaten und Trimethylammonium-Derivaten mittels  $^1\text{H}$ -NMR-Spektroskopie**

### *Probenvorbereitung*

- Abnahme von 10 ml Blut
- Verarbeitung der Blutprobe je nach gewähltem Probenmaterial (Serum, Plasma oder Vollblut)

- Zentrifugalultrafiltration von 4 ml Probenmaterial über einen 10-kD-Filter (z.B. Ultrafree- 4 B10; Millipore)
- Pipettieren von 600  $\mu$ l Ultrafiltrat in ein 5-mm-NMR-Röhrchen (z.B. 527-PP-7, Willmad, Buena, USA)
- Pipettieren von 100  $\mu$ l einer 3,5-mM-d<sub>4</sub>-TSP-D<sub>2</sub>O-Lösung als Konzentrationsstandard auf ein Probevolumen von 700  $\mu$ l (TSP = Natrium-Salz der Trimethyl-Silylpropion-Säure)
- pH-Messung im 5-mm-NMR-Röhrchen (z.B. 3-mm-Minitrode, Hamilton) unmittelbar prä- oder postanalytisch

### *Hochauflösende <sup>1</sup>H-NMR-Spektroskopie*

Die <sup>1</sup>H-NMR-Spektren werden beispielsweise an einem 600 MHz-Spektrometer (z.B. Bruker AMX 600) unter folgenden Bedingungen aufgenommen:

- Single-Pulse-Technik
- Wasserunterdrückung mit der Vorsättigungstechnik
- 30-90° RF-Impuls
- 5-15 sec Pulsrepetitionszeit
- 64-128 Scans (Abtastungen) pro Probe

Die <sup>1</sup>H-chemischen Verschiebungen werden auf TSP<sub>i</sub> intern bezogen. Die Charakterisierung von CH-, CH<sub>2</sub>- und CH<sub>3</sub>- Gruppen sowie weiterer protonentragerender Gruppen bekannter Substanzen wird anhand publizierter <sup>1</sup>H-Shift-Daten vorgenommen. Die Konzentrationsbestimmung einzelner Substanzen wird durch Bestimmung der Integrale der entsprechenden Protonenresonanzen und des TSP<sub>i</sub>-Konzentrationsstandards unter Berücksichtigung der jeweiligen Protonenanzahl und des Verdünnungsfaktors vorgenommen. Dabei wird die quantitative Auswertung der Spektren nach folgender Formel durchgeführt:

$$C_M = F_d \frac{C_{TSP} A_M N_{TSP}}{A_{TSP} N_M} \quad (\text{Formel 4})$$

$C_M$	= Konzentration des Metaboliten (M)
$C_{TSP}$	= Konzentration des Konzentrationsstandards
$A_M$	= Integral unterhalb des Peak of Interest (M)
$A_{TSP}$	= Integral des Konzentrationsstandards
$F_d$	= Verdünnungsfaktor durch die Hinzugabe des Konzentrationsstandards
$N_M$	= Anzahl der M - Protonen
$N_{TSP}$	= Protonenanzahl des Konzentrationsstandards

Die Methodik wurde von den Anmeldern für die Bestimmung von niedrig-molekularen Substanzen validiert und mit einem Korrelationskoeffizienten von  $r = 0,998$  mit enzymatischer Methoden korreliert. Fig. 1 zeigt ein  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum einer Blutprobe eines Patienten. Das Singulett der  $\text{N}(\text{CH}_3)_3$ -Gruppe von Cholin, Cholin-Derivaten und Trimethylammonium-Derivaten ist in  $^1\text{H}$ -NMR-Spektren im Mittel bei 3,205 ppm nachweisbar (siehe Fig. 2). Dabei kann das Signal je nach Untersuchungsbedingungen und Eigenschaften der Probe in einem Bereich von 3,19-3,22 ppm verschoben oder aufgepalten sein. Fig. 2 zeigt das Singulett bei 3,205 ppm, welches CCTD darstellt, bei einem Patienten mit akutem Myokardinfarkt (A) und bei einem Patienten ohne akuten Myokardinfarkt (B). Die Konzentration von CCTD wird entsprechend der oben genannten Methode bestimmt.

Neben der Bestimmung von CCTD bietet die  $^1\text{H}$ -NMR-Spektroskopie die Möglichkeit, in demselben Untersuchungsgang weitere Metabolite, wie Creatin (Singulett bei 3,93 ppm) und Dimethylamin (Singulett bei 2,727 ppm), zu bestimmen, die ebenfalls für die Infarktdiagnostik von Bedeutung sind. Die Kombination der Auswertung mehrerer Metabolite in einem

Untersuchungsgang (z.B. CCTD, Creatin und Dimethylamin) wird hier als Pattern-Recognition (Muster-Erkennung) bezeichnet. Gegenüber der isolierten Konzentrationsbestimmung von CCTD verbessert die Auswertung im Pattern-Recognition Modus die diagnostische Aussagekraft der Methode für die Erkennung akuter koronarer Syndrome.

**Ausführungsbeispiel: Bestimmung von Cholin, Cholin-Derivaten und Trimethylammonium-Derivaten mit biochemischen Methoden**

Die Erhebung von validen Meßwerten für CCTD kann ebenfalls durch andere Methoden, z.B. durch eine biochemische Methode erfolgen. Dabei ist zu beachten, daß unterschiedliche Methoden auch ein unterschiedliches Spektrum von CCTD erfassen können, so daß diese Methoden vor ihrer Anwendung auf ihre analytische Qualität und diagnostische Wertigkeit im Vergleich zur  $^1\text{H}$ -NMR-Spektroskopie überprüft werden müssen. Im folgenden Ausführungsbeispiel wird dabei eine Modifikation der enzymatischen Methode nach Takayama beschrieben (Takayama M. et al. 1977, Clin Chim Acta 79: 93-98).

- Herstellung der Reagenzien-Lösung: Auflösen von 45 U Phospholipase D, 100 U Cholin Oxidase, 220 U Peroxidase, 12 mg 4-Aminoantipyrin, 20 mg Phenol, 8 mg Calcium Chlorid Dihydrat in 100 ml eines 50 mM Tris/HCl Puffers (pH 7.8, mit 2 g Triton X-100 pro Liter)
- Abnahme von 10 ml Blut
- Verarbeitung der Blutprobe je nach gewähltem Probenmaterial (Serum, Plasma oder Vollblut)
- Zentrifugalultrafiltration von 4 ml Probenmaterial über einen 10-kD-Filter (z.B. Ultrafree- 4 B10; Millipore)
- Pipettieren von 20  $\mu\text{l}$  ultrafiltriertem Probenmaterial zu 3 ml Reagenzien-Lösung und Inkubation bei 37° über 20 Minuten

- Messung der Absorption bei 500 nm in einem kalibrierten UV-Spektrophotometer gegen die Blindprobe und Ermittlung der Konzentration

#### **Bewertung der Meßergebnisse von Cholin, Cholin-Derivaten und Trimethylammonium-Derivaten**

Die Bewertung der Meßergebnisse wird unter Berücksichtigung eines Grenzwertes vorgenommen. Der Grenzwert ist abhängig von der untersuchten Körperflüssigkeit und der gewählten Bestimmungsmethode und muß durch entsprechende Untersuchungen festgelegt werden. Es wird erwartet, daß der Grenzwert im Bereich von 15-30  $\mu\text{mol/l}$  liegt. Liegt der bestimmte Meßwert für CCTD höher als der Grenzwert, liegt ein akuter Myokardinfarkt vor. Wenn der Meßwert niedriger als der Grenzwert ist, kann ein akuter Myokardinfarkt nahezu ausgeschlossen werden. Bei der von den Anmeldern durchgeführten Methodik der Konzentrationsbestimmung von CCTD lag der Grenzwert bei etwa 22  $\mu\text{mol/l}$ .

Bei der Durchführung der  $^1\text{H}$ -NMR-Spektroskopie kann zusätzlich zur isolierten Konzentrationsbestimmung von CCTD eine Auswertung im Pattern-Recognition-Modus vorgenommen werden (z.B. zusätzliche Bestimmung von Creatin und Dimethylamin). Bei der Auswertung im Pattern-Recognition-Modus wurde die Erhöhung von CCTD oder Creatin bei gleichzeitig normalen Konzentrationen von Dimethylamin für die Diagnose des AMI herangezogen.

#### **Befunde bei untersuchten Patienten**

Insgesamt wurden 20 Patienten und Probanden (8 f, 12 m) im Alter von 22-68 Jahren, teilweise periodisch, mit insgesamt 44 Proben untersucht. Weitere 22 Proben wurden mit speziellen Fragestellungen untersucht. 10 Patienten hatten einen akuten Myokardinfarkt (4 Vorderwandinfarkte; 6 Hinterwandin-

farkte). Die Proben wurden in verschiedenen Intervallen, 1 bis 35 Stunden, nach Schmerzbeginn abgenommen. 60 % der Proben wurden in den ersten 6 Stunden nach Schmerzbeginn abgenommen. Alle Patienten mit AMI wurden koronarangiographiert (9 Patienten akut und 1 Patient im Verlauf). Bei 9 Patienten mit AMI wurden eine Reperfusionstherapie, d.h. Thrombolyse, primäre perkutane transluminale Koronarangioplastie (PTCA), Thrombolyse mit Rescue-PTCA oder akute aorto-koronare Venen-Bypass-Operation (ACVB-OP) durchgeführt. Bei einer Patientin zeigte sich in der akut durchgeführten Koronarangiographie ein spontane Rekanalisation im Infarktgefäß und ein Restthrombus mit gutem poststenotischen Fluß, so daß keine Primär-PTCA mehr durchgeführt wurde. In der Vergleichsgruppe wurde ein Patient mit heftigen akuten Thoraxschmerzen akut koronarangiographiert, wobei eine koronare Herzerkrankung ausgeschlossen werden konnte. In der Vergleichsgruppe bestanden verschiedene Erkrankungen wie instabile Angina pectoris, stabile Angina pectoris, Skelettmuskeltrauma, Myopathie, Z.n. Lungenembolie, Pleuritis und Niereninsuffizienz. Bei den Patienten mit akutem Myokardinfarkt zeigte sich ein typisches Muster an Komplikationen, wie Linksherzinsuffizienz und Herzrhythmusstörungen. Ein Patient mit einem Vorderwandinfarkt kam in einen reanimationspflichtigen kardiogenen Schock, den er aber nach Thrombolyse, Akut-PTCA mit Stent-Implantation und intraaortaler Ballonpumpen- (IABP)-Implantation überlebte.

In allen Proben wurden eine Konzentrationsbestimmung von CCTD durchgeführt.

Die Bewertung der Meßergebnisse von CCTD erfolgte unter Berücksichtigung eines Grenzwertes von 22  $\mu\text{mol/l}$ . Wie bereits ausgeführt, zeigen Meßwerte oberhalb des Grenzwertes einen akuten Myokardinfarkt an; bei Meßwerten unterhalb des Grenzwertes liegt dagegen kein akuter Myokardinfarkt vor. Die Bestimmung der diagnostischen Wertigkeit wurde Proben-bezo-

gen durchgeführt, d.h. die Bewertung des einzelnen Meßergebnisses wurde unabhängig von früheren oder späteren Meßergebnissen des Patienten vorgenommen. Bei 29 der 30 Infarkt-Proben waren die CCTD über  $22 \mu\text{mol/l}$  erhöht. Umgekehrt waren mit Ausnahme einer Probe die CCTD bei allen Patienten ohne Infarkt niedriger als  $22 \mu\text{mol/l}$ . Fig. 3 zeigt die Daten zur diagnostischen Wertigkeit von CCTD für die Diagnose eines akuten Myokardinfarktes für den Gesamtzeitraum von 0 bis 35 Stunden. Fig. 3 zeigt, daß CCTD mit 96.6 % die höchste Sensitivität und mit 95.4 % die höchste diagnostische Effizienz im Vergleich zu allen anderen Infarkt-Markern haben. Die hohe diagnostische Wertigkeit von CCTD ist auch deshalb bemerkenswert, weil viele diagnostisch schwierige Patienten untersucht wurden, d.h. Patienten mit Mikro-Infarkten (4 von 10 Patienten), Patienten in den ersten Stunden des Infarktes und Patienten mit Skelettmuskeltrauma.

CCTD waren in ihrer diagnostischen Wertigkeit insbesondere in der Frühphase des AMI den konventionellen Infarkt-Markern überlegen. Alle Infarkt-Patienten in der Zeitspanne von 0 bis 6 Stunden nach Schmerzbeginn waren CCTD-positiv, während nur 37.5 % der Infarkt-Patienten eine pathologische CK oder CK-MB hatten (siehe Fig. 4). Myoglobin hatte entsprechend seiner raschen Freisetzungskinetik die zweithöchste Sensitivität mit 62.5 %, ist aber, wie bekannt, nicht myokardspezifisch. In den ersten 6 Stunden wiesen nur 50 % der Proben der Patienten mit AMI eine pathologische Troponin I/T-Konzentration auf.

Die Vorteile von CCTD werden noch deutlicher, wenn man lediglich Patienten-Proben in den 0 bis 3 Stunden nach Schmerzbeginn betrachtet (Fig. 5). Während die konventionellen Infarkt-Marker in den ersten drei Stunden nach Schmerzbeginn kaum eine diagnostische Aussagekraft besitzen und eine diagnostische Effizienz zwischen 50% und 71% haben,

erkennen CCTD alle untersuchten Infarkt-Proben in den ersten 3 Stunden nach Schmerzbeginn. In der Spätphase des AMI kommt es zu einer geringen Verminderung der Sensitivität von CCTD.

Fig. 6 zeigt die diagnostische Wertigkeit von CCTD in der Spätphase des AMI. In der Spätphase des AMI lag die Sensitivität von CCTD bei 91,6 %. Bei einem Patienten kam es nach aggressiven Reperfusionenmaßnahmen (intravenöser Thrombolyse, Rescue-PTCA, Stent-Implantation und intraaortaler Ballonpumpe) in einer von 6 Patientenproben zum Unterschreiten des Grenzwertes von  $22 \mu\text{mol/l}$ . Die Unterschreitung des Grenzwertes bei diesem Patienten trat 4 Stunden nach einem CCTD-Peak auf, welcher 2 Stunden nach IABP-Implatation auftrat. Es ist denkbar, daß es durch die Verstärkung des myokardialen Auswaschphänomens im Rahmen der intraaortalen Gegenpulsation zunächst zu einem Peak und dann zu einer raschen Verminderung der CCTD-Konzentrationen kommt. Dieses Phänomen könnte verantwortlich für die einzige falsch-negative Probe sein.

Eine Erhöhung von CCTD war zu 92,8 % spezifisch für einen akuten Myokardinfarkt. Bei einer Patientin mit dialysepflichtiger terminaler Niereninsuffizienz bestand ebenfalls eine Erhöhung von CCTD, ohne daß eine akuter Myokardinfarkt vorlag. Es ist mit großer Wahrscheinlichkeit davon auszugehen, daß die Erhöhung von CCTD durch eine Akkumulation bei fehlender renaler Ausscheidung zustande kommt. Allerdings liegen schwere Nierenfunktionsstörungen bei Patienten mit akutem Brustschmerz verhältnismäßig selten vor und lassen sich unkompliziert feststellen, so daß die diagnostische Aussagekraft von CCTD davon nicht wesentlich beeinträchtigt wird.

Die Auswertung von  $^1\text{H}$ -NMR-Spektren im Pattern-Recognition-Modus (gleichzeitige Bestimmung von CCTD, Creatin und Dime-

thylamin) verbessert die diagnostische Aussagekraft der Methode, so daß bei den bisher durchgeführten Untersuchungen alle Infarkte mit 100 % Sensitivität und 100 % Spezifität zu jedem Zeitpunkt diagnostiziert bzw. ausgeschlossen werden konnten.

Patienten mit instabiler Angina pectoris haben bekanntermaßen eine schlechtere Prognose, wenn im Verlauf erhöhte Werte kardialer Troponine festgestellt werden (Ohman E.M. 1996, N Engl J Med 335: 1333-41). Man nimmt an, daß diese Patienten nicht nur eine Myokardischämie durchmachen, sondern auch myokardiale Mikronekrosen erleiden, so daß nicht auszuschließen ist, daß diese Patienten in Zukunft bei neuen Klassifikationen des AMI als Mikroinfarkte klassifiziert werden. Die rasche Identifizierung solcher Patienten ist wichtig, da sie in der Regel ohne Zeitverzug therapiert werden sollten und gegebenenfalls notfallmäßig angiographiert werden müssen. Die Untersuchungen der Anmelder zeigten, daß die Patienten mit Angina pectoris und unkompliziertem Verlauf keine erhöhten CCTD haben, hingegen alle Patienten mit myokardialen Mikronekrosen erhöhte CCTD-Werte aufweisen. Nach den bisherigen Ergebnissen entwickeln alle Patienten mit akuten koronaren Syndromen, die CCTD-positiv sind, ohne Ausnahme im Verlauf erhöhte Troponin-Werte. Die seriellen Untersuchungen zeigten ebenfalls, daß bei Patienten mit Mikronekrosen die CCTD um mehrere Stunden früher positiv waren als Troponin I oder Troponin T. Des weiteren ist davon auszugehen, daß das Verfahren ebenfalls hilfreich bei der Diagnostik schwerer myokardialer Ischämien, z.B. bei Katheterinterventionen an den Koronarien, oder bei Erkrankungen mit Beteiligung des Myokards, z.B. bei Myokarditiden, ist. Die Ergebnisse der Anmelder belegen, daß das Verfahren sowohl beim akuten Myokardinfarkt als auch bei der instabilen Angina pectoris, d.h. allgemein bei Verdacht auf ein akutes koronares Syndrom, wertvoll ist.

Da freigesetzte CCTD durch verschiedene biochemische Prozesse weiter modifiziert werden, entstehen neben Cholin, Cholin-Derivaten und Trimethylammonium-Derivaten auch vermehrt Reaktionsprodukte von CCTD. Diese Reaktionsprodukte können Bruchstücke oder bestimmte Metabolite von CCTD darstellen. Wie z.B. von den CK-Isoenzymen bekannt, kann die gleichzeitige Bestimmung solcher Reaktionsprodukte von Infarkt-Markern diagnostisch vorteilhaft sein. Die Untersuchungen der Anmelder zeigten bei einem Teil der Infarkt-Patienten Hinweise auf die Entstehung solcher Reaktionsprodukte von CCTD. Das Verfahren ist also auch durch den Nachweis bestimmter einfacher Reaktionsprodukte von CCTD gegebenenfalls in Kombination mit CCTD-Bestimmungen möglich.

#### **Zeitverlauf der Freisetzung von Cholin, Cholin-Derivaten und Trimethylammonium-Derivaten beim akuten Myokardinfarkt**

Die Analyse aller verfügbaren Meßwerte für CCTD (mit Ausschluß einer nicht-repräsentativen Probe) zeigte, daß CCTD innerhalb von 60 min nach Schmerzbeginn positiv werden und offenbar eine biphasische Freisetzungskinetik mit einem frühen Maximum nach 2 Stunden und einem zweiten Maximum nach 5 Stunden haben. Der Vergleich mit anderen Infarkt-Markern zeigte, daß die Freisetzungskinetik von CCTD entsprechend dem niedrigen Molekulargewicht schneller ist als die Freisetzung von den bisher eingeführten Markern, was die hohe diagnostische Wertigkeit in der Frühphase erklärt.

#### **Fehlender Einfluß eines Skelettmuskeltraumas auf Cholin, Cholin-Derivate und Trimethylammonium-Derivate**

Die Untersuchungen zeigten eine hohe Spezifität von CCTD von 92,8 %. In einem Probandenversuch wurde der Einfluß eines Skelettmuskeltraumas auf CCTD untersucht. Es wurde über einen Zeitraum von 4 Stunden isometrisches und isotonisches

Skelettmuskeltraining vorgenommen und in verschiedenen Intervallen Blutproben abgenommen. Dabei kam es 5 Stunden nach Beginn des Trainings zu einem Anstieg von Myoglobin auf 953 ng/ml und nach 24 Stunden zu einem ersten CK-Gipfel von 909 U/l und nach 72 Stunden einem zweiten CK-Gipfel von 990 U/l. Die CK normalisierte sich erst im Verlauf von über einer Woche. CCTD zeigten keine Beeinflussung durch ein Skelettmuskeltrauma, und die Kontrollen nach Skelettmuskeltrauma lagen alle im Bereich des Ausgangswertes. Der Einfluß einer Skelettmuskelläsion ist für viele Infarkt-Marker wie CK und Myoglobin ein entscheidender Nachteil. Eine Freisetzung von CCTD scheint, ähnlich wie bei den kardialen Troponinen, nicht bei Skelettmuskelläsionen zu erfolgen.

#### **Fehlender Einfluß einer körperlichen Belastung auf Cholin, Cholin-Derivate und Trimethylammonium-Derivate**

Eine starke anaerobe körperliche Belastung führt nicht nur zur Freisetzung von Substanzen aus dem Skelettmuskel, sondern bedeutet auch eine verstärkte anaerobe Energiegewinnung mit Azidose und Laktatproduktion insbesondere in der Skelettmuskulatur. Zur Untersuchung der Einflüsse einer körperlichen Belastung auf CCTD bei anaerober Energiegewinnung in der Skelettmuskulatur wurde ein Probandenversuch durchgeführt. Dafür wurde ein 400-Meter-Lauf mit maximal-angestrebter Leistung durchgeführt. Blutproben wurden vor und nach Belastung abgenommen. Dabei kam es zu einem Anstieg des (venösen) Laktatspiegels von 3.3 mmol/l (30.4 mg/dl) auf 14.4 mmol/l (130 mg/dl). Der pH verminderte sich von 7.3 auf 7.08 und der Base Excess fiel von 0.6 mmol/l auf -15.8 mmol/l als Ausdruck der ausgeprägten anaeroben Stoffwechselsituation der Skelettmuskulatur. Die CCTD zeigten keine Beeinflussung durch die körperliche Belastung und die anaerobe Stoffwechselsituation der Skelettmuskulatur, und die Konzentrationen waren vor und nach Belastung praktisch identisch.

Das Verfahren zur Erkennung des akuten Myokardinfarktes und schwerer Formen der instabilen Angina pectoris durch die Bestimmung und Bewertung des Gehaltes von Cholin, Cholin-Derivaten und Trimethylammonium-Derivaten in Körperflüssigkeiten scheint allen bisher eingeführten nicht-invasiven Verfahren, einschließlich der Bestimmung bekannter biochemischer Marker zur Diagnostik akuter koronarer Syndrome, überlegen zu sein. Probleme könnten die renale Elimination von CCTD, mit einem Anstieg bei Niereninsuffizienz, und verstärkte myokardiale Auswaschphänomene einige Stunden nach IABP-Implantation sein. Diese Probleme sind aber ausgesprochen selten und treten gegenüber der hervorragenden Aussagekraft des Verfahrens mit einer hohen Sensitivität und Spezifität für die Früherkennung des akuten Myokardinfarktes in den Hintergrund. Neben dem akuten Myokardinfarkt können ebenfalls schwere Formen der instabilen Angina pectoris mit myozytären Nekrosen, welche im Verlauf erhöhte Troponin-Werte aufweisen, durch das Verfahren frühzeitiger erkannt werden. Diese Ergebnisse belegen, daß das Verfahren sowohl beim akuten Myokardinfarkt als auch bei der instabilen Angina pectoris, d.h. allgemein bei Verdacht auf ein akutes koronares Syndrom, wertvoll ist. Das Verfahren ist weitgehend unabhängig von der gewählten Bestimmungsmethode, da gleichwertige Meßergebnisse bestimmter Substanzen häufig mit unterschiedlichen Meßmethoden zu erheben sind, die im Fall von CCTD vielfältig in der Literatur beschrieben worden sind. Das Verfahren umfaßt neben der Auswahl einer geeigneten Meßmethode die Auswahl einer geeigneten Körperflüssigkeit, die verfahrens- und methodengerechte Probenvorbereitung, die Messung des Gehaltes von Cholin, Cholin-Derivaten und/oder Trimethylammonium-Derivaten und die verfahrensgerechte Auswertung zur Diagnostik von Patienten mit akuten koronaren Syndromen. Da die Freisetzung von CCTD in verschiedene andere Körperflüssigkeiten und Körperbestandteile erfolgt, ist die Anwendung des Verfahrens auch bei der Untersuchung anderer Körperbestandteile, z.B. Gewebeproben, möglich. Dabei

ist allerdings die diagnostische Wertigkeit im Vergleich zu dem beschriebenen Anwendungsbeispiel möglicherweise vermindert. Da im Rahmen der Freisetzung von CCTD auch vermehrt Reaktionsprodukte der CCTD anfallen, ist das Verfahren somit auch durch den Nachweis solcher Reaktionsprodukte möglich. Des weiteren ist es möglich, daß das Verfahren so durchgeführt wird, daß semi-quantitative oder qualitative Aussagen getroffen werden, d.h. daß z.B. Schnell-Tests für CCTD durch eine Farbreaktion lediglich anzeigen, ob ein Infarkt vorliegt oder nicht. Das Verfahren kann so durchgeführt werden, daß Zustände oder Vorgänge beobachtet oder hervorgerufen werden, die durch den Gehalt von CCTD oder CCTD-Reaktionsprodukten determiniert werden, wie dies z.B. bei der  $^1\text{H}$ -NMR-Spektroskopie von Organen vorgenommen wird. Neben der Erkennung von akuten koronaren Syndromen bietet das Verfahren Aussicht auf weitere diagnostische Informationen wie Infarktgröße, Prognose, Therapiekontrolle und der Vorhersage bestimmter Komplikationen, Risiken und des klinischen Verlaufs.

Insgesamt soll das Verfahren helfen, die erheblichen Probleme der derzeitigen Frühdiagnostik akuter koronarer Syndrome zu vermindern und die Diagnostik und Therapie der erkrankten Patienten zu verbessern.

Die in der vorstehenden Beschreibung, den Ansprüchen und der Zeichnung offenbarten Merkmale können sowohl einzeln als auch in beliebiger Kombination für die Verwirklichung der Erfindung von Bedeutung sein.



# BOEHMERT & BOEHMERT

## ANWALTSSOZIOETÄT

Boehmert & Boehmert • Helene-Lange-Straße 3 • D-14469 Potsdam

An das  
Deutsche Patentamt  
Zweibrückenstr. 12  
80297 München

DR.-ING. KARL BOEHMERT, PA (1933-1973)  
DIPLO.-ING. ALBERT BOEHMERT, PA (1954-1993)  
WILHELM J. H. STAHLBERG, RA, BREMEN  
DR.-ING. WALTER HOORMANN, PA\*, BREMEN  
DIPLO.-PHYS. DR. HEINZ GODDAR, PA\*, MÜNCHEN  
DR.-ING. ROLAND LIESEGANG, PA\*, MÜNCHEN  
WOLF-DIETER KUNTZE, RA, BREMEN, ALICANTE  
DIPLO.-PHYS. ROBERT MÜNZHUBER, PA (1965-1992)  
DR. LUDWIG KOUKER, RA, BREMEN  
DR. (CHEM.) ANDREAS WINKLER, PA\*, BREMEN  
MICHAELA HUTH-DIERIG, RA, MÜNCHEN  
DIPLO.-PHYS. DR. MARION TÖNNHARDT, PA\*, DÜSSELDORF  
DR. ANDREAS EBERT-WEIDENFELLER, RA, BREMEN  
DIPLO.-ING. EVA LIESEGANG, PA\*, BERLIN

PA - Patentanwalt/Patent Attorney  
RA - Rechtsanwalt/Attorney at Law  
\* - European Patent Attorney

Alle zugelassen zur Vertretung vor dem EU-Markenamts, Alicante  
Professional Representation at the EU-Trademark Office, Alicante

PROF. DR. WILHELM NORDEMANN, RA, BRANDENBURG  
DR. AXEL NORDEMANN, RA, POTSDAM  
DR. JAN BERND NORDEMANN, LL.M., RA, BERLIN  
DIPLO.-PHYS. EDUARD BAUMANN, PA\*, HÖHENKIRCHEN  
DR.-ING. GERALD KLÖPSCH, PA\*, DÜSSELDORF  
DR. (CHEM.) HELGA KUTZENBERGER, PA\*, DÜSSELDORF  
DIPLO.-ING. HANS W. GROENING, PA\*, MÜNCHEN  
DR. ANKE SCHIERHOLZ, RA, POTSDAM  
DIPLO.-ING. DR. JAN TÖNNIES, PA, RA, KIEL  
DIPLO.-PHYS. CHRISTIAN BIEHL, PA\*, KIEL  
DIPLO.-PHYS. DR. DOROTHEE WEBER-BRULS, PA\*, FRANKFURT  
DR.-ING. MATTHIAS PHILIPP, PA\*, BREMEN  
DIPLO.-PHYS. DR. STEFAN SCHOBE, PA\*, LEIPZIG  
MARTIN WIRTZ, RA, BREMEN  
DR. DETMAR SCHÄFER, RA, BREMEN  
DIPLO.-CHEM. DR. ROLAND WEIB, PA, DÜSSELDORF  
DIPLO.-PHYS. DR.-ING. UWE MANASSE, PA, BREMEN  
DR. CHRISTIAN CZYCHOWSKI, RA, BERLIN

Ihr Zeichen  
Your ref.  
Neuanmeldung

Ihr Schreiben  
Your Letter of

Unser Zeichen  
Our ref.  
D 2867

Potsdam

12. August 1998

Univ.-Prof. Dr. med. Ulrich Frei  
Dr. med. Oliver Danne  
Univ.-Prof. Dr. Dr. h.c. Adolf Zschunke  
Privatdozent Dr. sc. nat. Clemens Mügge

Verfahren zur Erkennung und Diagnostik akuter  
koronarer Syndrome

### Patentansprüche

1. Verfahren zur Erkennung und Diagnostik akuter koronarer Syndrome, insbesondere des akuten Myokardinfarktes, dadurch gekennzeichnet, daß der Gehalt von Cholin, Cholin-Derivaten und/oder Trimethylammonium-Derivaten in Körperflüssigkeiten oder Körperbestandteilen bestimmt wird.

2157

Helene-Lange-Straße 3 • D-14469 Potsdam • Telefon (03 31) 27 54 30 • Telefax (03 31) 2 75 43 21

MÜNCHEN - BREMEN - BERLIN - FRANKFURT - DÜSSELDORF - POTSDAM - BRANDENBURG - HÖHENKIRCHEN - KIEL - LEIPZIG - ALICANTE  
e-mail: Postmaster@Boehmert.Boehmert.de

2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß der Gehalt von Cholin, Cholin-Derivaten und/oder Trimethylammonium-Derivaten unter Berücksichtigung eines Grenzwertes bewertet wird.
3. Verfahren zur Erkennung und Diagnostik akuter koronarer Syndrome, insbesondere des akuten Myokardinfarktes, dadurch gekennzeichnet, daß der Gehalt von Reaktionsprodukten von Cholin, Cholin-Derivaten und/oder Trimethylammonium-Derivaten in Körperflüssigkeiten oder Körperbestandteilen bestimmt wird.
4. Verfahren zur Erkennung und Diagnostik akuter koronarer Syndrome, insbesondere des akuten Myokardinfarktes, dadurch gekennzeichnet, daß in Körperflüssigkeiten oder Körperbestandteilen ein Zustand oder Vorgang beobachtet wird, der durch den Gehalt von Cholin, Cholin-Derivaten, Trimethylammonium-Derivaten und/oder ihren Reaktionsprodukten bestimmt wird.
5. Verfahren zur Erkennung und Diagnostik akuter koronarer Syndrome, insbesondere des akuten Myokardinfarktes, dadurch gekennzeichnet, daß quantitative, semi-quantitative oder qualitative Beobachtungen gemacht werden, die durch den Gehalt von Cholin, Cholin-Derivaten, Trimethylammonium-Derivaten und/oder ihren Reaktionsprodukten in Körperflüssigkeiten oder Körperbestandteilen bestimmt werden.
6. Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß zur Bestimmung von Cholin, Cholin-Derivaten, Trimethylammonium-Derivaten und/oder ihren Reaktionsprodukten Kernspinresonanz (NMR) -Methoden, biochemische, enzymatische, immunologische, klinisch-chemische, chromatographische, massenspektrome-

trische, elektrochemische oder photometrische Methoden eingesetzt werden.

7. Verfahren zur Erkennung und Diagnostik akuter koronarer Syndrome, insbesondere des akuten Myokardinfarktes, dadurch gekennzeichnet, daß eine NMR-Spektroskopie von Körperflüssigkeiten oder Körperbestandteilen durchgeführt wird und die Auswertung durch eine "Muster-Erkennung" (Pattern-Recognition) mehrerer Substanzen, insbesondere Cholin, Cholin-Derivate, Trimethylamonium-Derivate, Creatin und Dimethylamin, vorgenommen wird.
8. Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß eine Bestimmung von Cholin, Cholin-Derivaten, Trimethylammonium-Derivaten und/oder ihren Reaktionsprodukten vorgenommen wird in einer Körperflüssigkeit, die ausgewählt ist aus eiener Gruppe, die Serum, Plasma, Vollblut, aufbereiteten Blutproben und Harn umfaßt.
9. Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß eine Erkennung oder ein Ausschluß eines akuten Myokardinfarktes oder einer instabilen Angina pectoris vorgenommen werden soll oder eine andersartige diagnostische Aussage zum Krankheitsbild getroffen wird.
10. Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, daß eine Erkennung oder ein Ausschluß einer Myokardischämie oder einer Erkrankung mit Beteiligung des Myokards vorgenommen werden soll oder eine andersartige diagnostische Aussage zu den Krankheitsbildern vorgenommen wird

11. Mittel zur Verwendung bei der Diagnose und/oder Analyse von akuten koronaren Syndromen, insbesondere des akuten Myokardinfarktes, geeignet für Verfahren gemäß den Ansprüchen 1-10.
12. Testkit zur Diagnose und/oder Analyse von akuten koronaren Syndromen, insbesondere des akuten Myokardinfarktes, dadurch gekennzeichnet, daß er Mittel zum Aufnehmen einer Körperflüssigkeit oder eines Körperbestandteils und Mittel zum Nachweisen von Cholin, Cholin-Derivaten, Trimethylammonium-Derivaten und/oder ihren Reaktionsprodukten in der Körperflüssigkeit oder dem Körperbestandteil aufweist.
13. Testkit nach Anspruch 12, dadurch gekennzeichnet, daß die Mittel zum Nachweisen anzeigen, wenn ein Grenzwert für den Gehalt von Cholin, Cholin-Derivaten, Trimethylammonium-Derivaten bzw. ihren Reaktionsprodukten in der Körperflüssigkeit oder dem Körperbestandteil überschritten ist.

D 2867

---

Verfahren zur Erkennung und Diagnostik akuter  
koronarer Syndrome

---

**Zusammenfassung**

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Erkennung akuter koronarer Syndrome, insbesondere des akuten Myokardinfarktes, durch die Bestimmung und Bewertung des Gehaltes von Cholin, Cholin-Derivaten und/oder Trimethylammonium-Derivaten in geeigneten Körperflüssigkeiten oder Körperbestandteilen, welches folgende Schritte umfaßt: Entnahme einer Probe einer geeigneten Körperflüssigkeit oder eines Körperbestandteils; Bestimmung des Gehaltes von Cholin, Cholin-Derivaten und/oder Trimethylammonium-Derivaten mit einer geeigneten Bestimmungsmethode (Kernspinresonanz-Methoden, biochemische, enzymatische, immunologische, klinisch-chemische, chromatographische, massenspektrometrische, elektrochemische, photometrische Methoden oder andere Methoden zur Bestimmung von Cholin, Cholin-Derivaten und/oder Trimethylammonium-Derivaten); und Bewertung der Meßergebnisse von Cholin, Cholin-Derivaten und/oder Trimethylammonium-Derivaten unter Berücksichtigung eines Grenzwertes zur Erkennung bzw. zum Ausschluß akuter koronarer Syndrome, insbesondere eines akuten Myokardinfarktes.

N 09:09:09

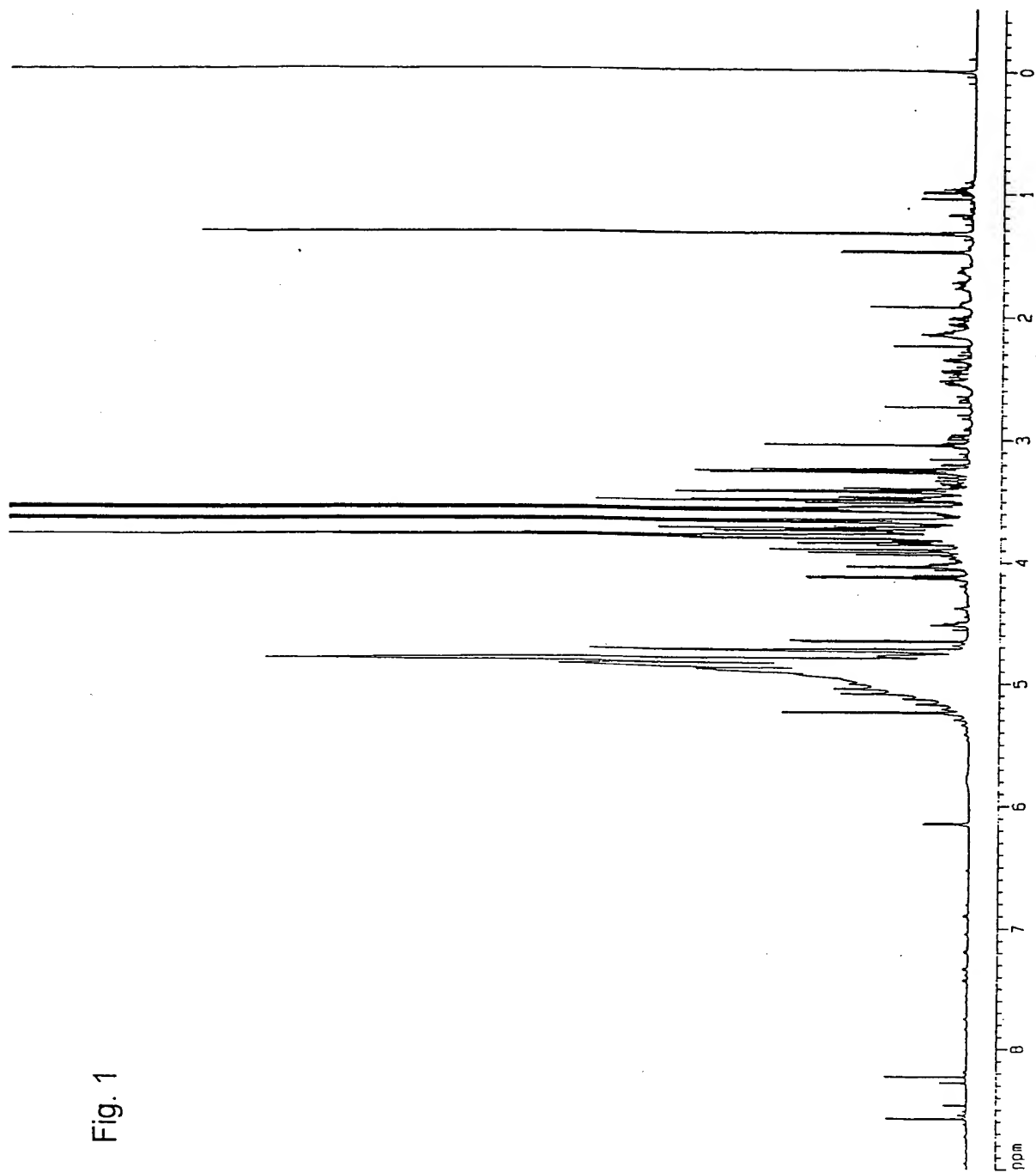
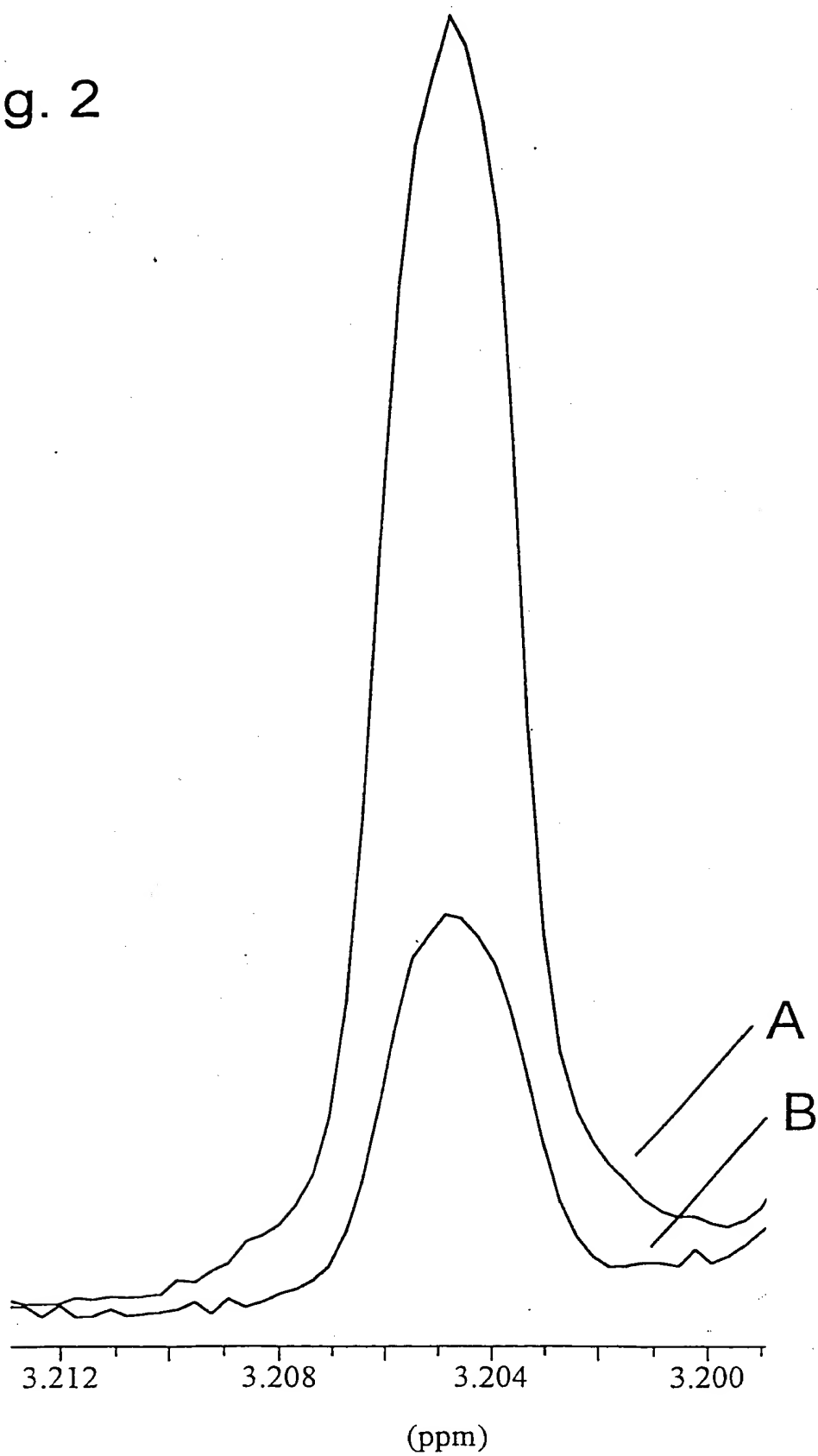


Fig. 1

M 00:00.00

Fig. 2



Gesamtzeitraum (0-35h)	CCTD ( $> 22 \mu\text{mol/l}$ )	CK ( $> 100 \text{ U/l}$ )	CK-MB ( $\geq 6\%$ der CK)	Myo ( $> 90 \text{ ng/ml}$ )	cTnI/T (cTnI $> 1,5 \mu\text{g/l}$ )
Sensitivität	96.6 %	57.1 %	57.1 %	60.7 %	69.5 %
Spezifität	92.8 %	71.4 %	100 %	64.2 %	92.8 %
positiver prädiktiver Wert	96.6 %	80.0 %	100 %	77.2 %	94.7 %
negativer prädiktiver Wert	92.8 %	45.4 %	53.8 %	45.0 %	52.0 %
diagnostische Effizienz	95.4 %	61.9 %	71.4 %	61.9 %	70.4 %

Fig. 3: Diagnostische Wertigkeit von Cholin, Cholin-Derivaten und Trimethylammonium-Derivaten (CCTD) im Vergleich zu anderen Infarkt-Markern im Gesamtzeitraum (0-35 h)  
 Probenanzahl (n) Infarktgruppe: CCTD n=30, CK/CK-MB/Myoglobin (Myo) n=28, TroponinI/T (cTnI/T) n=23; Vergleichsgruppe: alle Marker n=14

Frühphase des AMI (0-6 h)	CCTD ( $> 22 \mu\text{mol/l}$ )	CK ( $> 100 \text{ U/l}$ )	CK-MB ( $\geq 6\%$ der CK)	Myo ( $> 90 \text{ ng/ml}$ )	cTnI/T (cTnI $> 1,5 \mu\text{g/l}$ )
Sensitivität	100 %	37.5 %	37.5 %	62.5 %	50.0 %
Spezifität	92.8 %	71.4 %	100 %	64.2 %	92.8 %
positiv prädiktiver Wert	94.7 %	60.0 %	100 %	66.6 %	87.5 %
negativer prädiktiver Wert	100 %	50.0 %	58.3 %	60.0 %	65.0 %
diagnostische Effizienz	96.8 %	53.3 %	66.6 %	63.3 %	71.4 %

Fig. 4: Diagnostische Wertigkeit von Cholin, Cholin-Derivaten und Trimethylammonium-Derivaten (CCTD) im Vergleich zu anderen Infarkt-Markern in der Frühphase des AMI (0-6 h)  
 Probenanzahl (n) Infarktgruppe: CCTD n=18, CK/CK-MB/Myoglobin (Myo) n=16, Troponin I/T (cTnI/I/T) n=14; Vergleichsgruppe: alle Marker n=14

Frühphase des AMI (0-3 h)	CCTD ( $> 22 \mu\text{mol/l}$ )	CK ( $> 100 \text{ U/l}$ )	CK-MB ( $\geq 6\%$ der CK)	Myo ( $> 90 \text{ ng/ml}$ )	cTnI/I (cTnI $> 1,5 \mu\text{g/l}$ )
Sensitivität	100 %	12.5 %	12.5 %	50.0 %	28.5 %
Spezifität	92.8 %	71.4 %	100 %	64.2 %	92.8 %
positiver prädiktiver Wert	88.8 %	20.0 %	100 %	44.4 %	66.6 %
negativer prädiktiver Wert	100 %	58.8 %	66.6 %	69.2 %	72.2 %
diagnostische Effizienz	95.4 %	50.0 %	68.1 %	59.0 %	71.4 %

Fig 5: Diagnostische Wertigkeit von Cholin, Cholin-Derivaten und Trimethylammonium-Derivaten (CCTD) im Vergleich zu anderen Infarkt-Markern in der Frühphase des AMI (0-3 h)  
 Probenanzahl (n) Infarktgruppe: CCTD n=8, CK/CK-MB/Myoglobin (Myo) n=8, Troponin I/T (cTnI/I/T) n=7; Vergleichsgruppe: alle Marker n=14

Spätphase des AMI (7-35 h)	CCTD ( $> 22 \mu\text{mol/l}$ )	CK ( $> 100 \text{ U/l}$ )	CK-MB ( $\geq 6\%$ der CK)	Myo ( $> 90 \text{ ng/ml}$ )	cTnI/T (cTnI $> 1,5 \mu\text{g/l}$ )
Sensitivität	91.6 %	83.3 %	83.3 %	58.3 %	100 %
Spezifität	92.8 %	71.4 %	100 %	64.2 %	92.8 %
positiver prädiktiver Wert	91.6 %	71.4 %	100 %	58.3 %	90.0 %
negativer prädiktiver Wert	92.8 %	83.3 %	87.5 %	64.2 %	100 %
Diagnostische Effizienz	92.3 %	76.9 %	92.3 %	61.5 %	69.6 %

Fig 6: Diagnostische Wertigkeit von Cholin, Cholin-Derivaten und Trimethylammonium-Derivaten (CCTD) im Vergleich zu anderen Infarkt-Markern in der Spätphase des AMI (7-35 h)  
 Probenanzahl (n) Infarktgruppe: CCTD n=12, CK/CK-MB/Myoglobin (Myo) n=12, Troponin I/T (cTnI/T) n=9; Vergleichsgruppe: alle Marker n=14